

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 4 月 24 日 (24.04.2003)

PCT

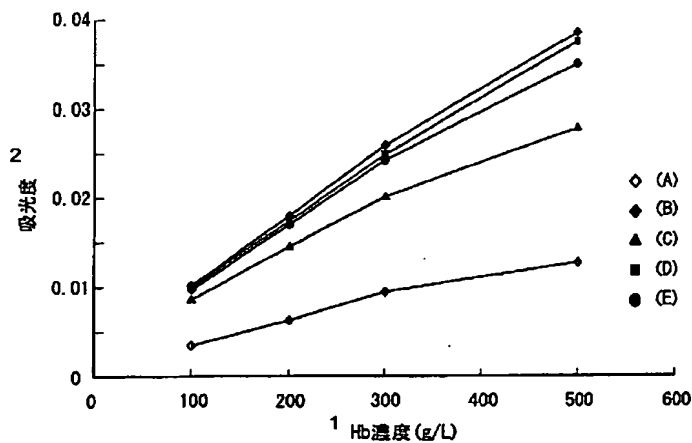
(10) 国際公開番号  
WO 03/033730 A1

- (51) 国際特許分類: C12Q 1/26, G01N 33/50, 33/15 (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 堀井 美希 (HORII, Miki) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市 南区 東九条西明田町57番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP). 石丸 香 (ISHIMARU, Kaori) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市 南区 東九条西明田町57番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/10464
- (22) 国際出願日: 2002 年 10 月 9 日 (09.10.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2001-314217  
2001 年 10 月 11 日 (11.10.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アークレイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市 南区 東九条西明田町57番地 Kyoto (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR MEASUREMENT USING SODIUM AZIDE

(54) 発明の名称: アジ化ナトリウムを用いた測定方法



1...Hb CONCENTRATION (g/L)  
2...ABSORBANCE

(57) Abstract: A method for the measurement of a material to be measured contained in a sample using an oxidation-reduction reaction, characterized in that an amount of a reduced material or an oxidized material derived from the material to be measured is measured in the presence of a tetrazolium compound and sodium azide using the oxidation-reduction reaction, and the amount of the material to be measured is determined from the measured value for the amount of the reduced or oxidized material. Preferably, the molar ratio of a tetrazolium compound and sodium azide is in the range of 20 : 3 to 20 : 12 and a solution containing a tetrazolium compound and sodium azide is aged in advance and then added. The method exhibits improved precision of measurement.

[続葉有]

WO 03/033730 A1



TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

---

(57) 要約:

酸化還元反応を用いた測定方法であって、測定精度に優れる方法を提供する。テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムの存在下で、試料中の測定対象物由来の還元物質または酸化物質の量を前記酸化還元反応により測定し、この測定値から前記測定対象物の量を決定する。テトラゾリウム化合物とアジ化ナトリウムの添加割合は、20 : 3 ~ 20 : 12の範囲である。また、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを含む溶液を、予めエージングしてから、測定試料に添加することが好ましい。

## 明 細 書

## アジ化ナトリウムを用いた測定方法

## 技術分野

本発明は、酸化還元反応を用いた測定方法に関する。

5

## 背景技術

従来から、酸化還元反応を利用して、試料中の測定対象物の量を測定することは、広く実施されており、例えば、生化学分析や臨床検査等における糖化タンパク質の測定にも適用されている。

10     例えば、血液中の糖化タンパク質、特に赤血球中の糖化ヘモグロ빈は、生体血糖値の過去の履歴を反映しているため、糖尿病診断や治療等における重要な指標とされている。このような赤血球中の糖化タンパク質は、前記酸化還元反応を用いて、例えば、以下に示すようにして測定されている。

15     まず、赤血球を溶血させた試料を調製し、この溶血試料をフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（以下、「FAOD」という）で処理し、糖化タンパク質の糖化部分に作用させて過酸化水素を発生させる。この過酸化水素量は、前記糖化タンパク質量に対応する。そして、この試料に、  
20     ペルオキシダーゼ（以下、「POD」という）および還元剤を添加し、前記PODを触媒として前記過酸化水素と前記還元剤との間で酸化還元反応させる。この時、前記還元剤として、酸化されることにより発色する還元剤を用いれば、その発色の測定により前記過酸化水素量を測定でき、この結果、赤血球中の糖化タンパク質量を知ることができる。

## 発明の開示

しかし、これらの従来の方法では、試料によっては測定感度が十分でないために、測定精度が向上しない場合もある。また、前述のように、血液中の糖化タンパク質は、糖尿病診断や治療等における重要な指標と  
5 されているため、これを測定するための酸化還元反応を用いた測定方法においても、更なる測定精度の向上が望まれている。

そこで、本発明の目的は、試料中の測定対象物を、酸化還元反応を用いて測定する方法であって、測定感度に優れる測定方法の提供である。

10 前記目的を達成するために、本発明の測定方法は、試料中の測定対象物を酸化還元反応を用いて測定する方法であって、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムの存在下で、前記測定対象物由来の還元物質または酸化物質の量を前記酸化還元反応により測定し、この測定値から前記測定対象物の量を決定することを特徴とする。このようにテトラゾ  
15 リウム化合物およびアジ化ナトリウムの存在下で測定を行えば、その作用機作は不明であるが、測定感度を向上させることができる。なお、本発明において、「測定対象物由来の還元物質または酸化物質」とは、測定対象物そのもの、もしくは、その中の酸化還元物質、または測定対象物から酸化還元酵素等を用いて発生した酸化還元物質の双方を意味する  
20 。

本発明の測定方法において、テトラゾリウム化合物（A）とアジ化ナトリウム（B）との添加割合（モル比A：B）が、 $A : B = 20 : 3 \sim 20 : 12$ の範囲であることが好ましい。

本発明の測定方法において、例えば、前記酸化還元反応の反応溶液に  
25 おけるテトラゾリウム化合物の終濃度が、 $0.5 \sim 2.5 \text{ mmol/L}$ の範囲であり、前記反応溶液におけるアジ化ナトリウムの終濃度が0.

1.3 ~ 1.3 mmol/L の範囲であることが好ましい。

本発明の測定方法において、より一層感度を向上できることから、テトラゾリウム化合物とアジ化ナトリウムとを含む溶液をエージングした後、前記試料に添加することが好ましい。

- 5 前記エージングの処理温度は、20 ~ 60℃の範囲であることが好ましく、また、エージングの処理時間は、6時間以上であることが好ましく、より好ましくは6 ~ 120時間の範囲である。

本発明の測定方法において、テトラゾリウム化合物が2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルフィドフェニル)-2H-テトラゾリウム塩であること

- 10 が好ましい。

本発明の測定方法において、前記測定対象物由来の酸化物質が、過酸化水素であり、前記酸化還元反応の測定が、前記過酸化水素量の測定であることが好ましい。この過酸化水素量の測定は、例えば、酸化酵素と酸化により発色する基質（以下、発色性基質という）とを用いた測定で

- 15 あることが好ましい。

本発明の測定方法において、前記試料の種類は、特に制限されず、全血、血漿、血清、血球等の他に、例えば、尿、髄液等の生体試料や、ジュース等の飲料水、醤油、ソース等の食品類等の試料に対しても適用できる。

- 20 また、前記測定対象物としては、前記酸化還元反応を利用するものであれば特に制限されない。例えば、全血中成分、赤血球内成分、血漿中成分、血清中成分、尿成分、髄液成分等があげられるが、好ましくは赤血球内成分である。例えば、前記赤血球成分を測定する場合、全血をそのまま溶血させたものを試料としてもよいし、全血から赤血球を分離して、前記赤血球を溶血させたものを試料として用いてもよい。また、測定対象物としては、例えば、糖化ヘモグロビン、糖化アルブミン等の糖
- 25

化タンパク質、糖化ペプチド、糖化アミノ酸、グルコース、尿酸、コレステロール、クレアチニン、サルコシン、グリセロール等もあげられ、より好ましくは糖化タンパク質である。

- 5 本発明の測定方法において、前記測定対象物が糖化タンパク質の場合、前記糖化タンパク質の糖化部分をF A O Dで酸化分解することにより過酸化水素を生成させることが好ましい。また、前記糖化ペプチド、糖化アミノ酸も、同様にF A O Dを作用させることが好ましい。なお、前記糖化タンパク質や糖化ペプチドは、必要に応じて、前記F A O D処理前に、プロテアーゼ処理することが好ましい。

10

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明の測定方法の一実施例において、添加したテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムのモル比と、H b濃度と、吸光度との相関関係を示したグラフである。

- 15 図2は、本発明の測定方法のその他の実施例において、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを含む溶液のエージング時間と吸光度との関係を示したグラフである。

- 図3は、本発明の測定方法のさらにその他の実施例において、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを含む溶液のエージング時間と吸光度との関係を示したグラフである。
- 20

#### 発明を実施するための最良の形態

- 本発明におけるテトラゾリウム化合物としては、例えば、テトラゾール環の少なくとも2箇所に環構造置換基を有する構造であることが好ましく、より好ましくは、3箇所に環構造置換基を有する構造である。
- 25

前記テトラゾリウム化合物が、前述のように、前記テトラゾール環の

少なくとも2箇所に環構造置換基を有する場合、前記置換基を、前記テトラゾール環の2位および3位に有することが好ましい。また、テトラゾリウム化合物が3箇所に環構造置換基を有する場合は、前記置換基を、前記テトラゾール環の2位、3位および5位に有することが好ましい。  
5。

また、テトラゾリウム化合物は、少なくとも2つの環構造置換基の環構造がベンゼン環であることが好ましい。前記ベンゼン環以外の環構造置換基としては、例えば、環骨格にSまたはOを含み、かつ共鳴構造である置換基があげられ、例えば、チエニル基、チアゾイル基等である。

10 また、前記テトラゾリウム化合物は、テトラゾール環の少なくとも3箇所に環構造置換基を有し、前記環構造置換基のうち少なくとも2つの環構造置換基の環構造がベンゼン環であることが好ましい。

また、少なくとも1つの環構造置換基が官能基を有することが好ましく、前記官能基の数が多いことがより好ましい。

15 前記官能基としては、電子吸引性の官能基が好ましく、例えば、ハロゲン基、エーテル基、エステル基、カルボキシ基、アシル基、ニトロソ基、ニトロ基、ヒドロキシ基、スルホ基等があげられる。この他にも、例えば、ヒドロペルオキシ基、オキシ基、エポキシ基、エピジオキシ基、オキシ基等の酸素を含む特性基や、メルカプト基、アルキルチオ基、  
20 メチルチオメチル基、チオキシ基、スルフィノ基、ベンゼンスルホニル基、フェニルスルホニル基、p-トルエンスルホニル基、p-トリルスルホニル基、トシル基、スルファモイル基、イソチオシアネート基等の硫黄を含む特性基等があげられる。これらの電子吸引性官能基の中でも、好ましくは、ニトロ基、スルホ基、ハロゲン基、カルボキシ基、ヒドロキシ  
25 シ基、メトキシ基、エトキシ基である。また、前記電子吸引性の官能基の他に、例えば、フェニル基 ( $C_6H_5-$ )、スチリル基 ( $C_6H_5CH$

=CH-)等の不飽和炭化水素基等もあげられる。なお、前記官能基は、解離によりイオン化していてもよい。

前記テトラゾリウム化合物は、テトラゾール環の2位および3位にベンゼン環を有し、前記ベンゼン環のうち少なくとも一方が、ハロゲン基、カルボキシ基、ニトロ基、ヒドロキシ基、スルホ基、メトキシ基およびエトキシ基からなる群から選択された少なくとも1つの官能基を有することが好ましい。なお、前記両方のベンゼン環が、前記官能基を有してもよい。前記ベンゼン環において、いずれの箇所(ortho-, meta-, para-)に前記官能基を有してもよい。また、官能基の数も特に制限されず、同じ官能基を有しても、異なる官能基を有してもよい。

前記テトラゾリウム化合物は、例えば、前記テトラゾール環の2位、3位および5位にベンゼン環構造置換基を有する化合物として、例えば、2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩、2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩、2-(2-メトキシ-4-ニトロフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩、2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウム塩、3,3'-(1,1'-ビフェニル-4,4'-ジル)-ビス(2,5-ジフェニル)-2H-テトラゾリウム塩、3,3'-[3,3'-ジメトキシ-(1,1'-ビフェニル)-4,4'-ジル]-ビス[2-(4-ニトロフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウム塩]、2,3-ジフェニル-5-(4-クロロフェニル)テトラゾリウム塩、2,5-ジフェニル-3-(p-ジフェニル)テトラゾリウム塩、2,3-ジフェニル-5-(p-ジフェニル)テトラゾリウム塩、2,5-ジフェニル-3-(4-スチリルフェニル)テトラゾリウム塩、2,5-ジフェニル-3-(m-トリル)テトラゾリウム塩および2,5-ジフェニル-3-(p-トリル)テトラゾリウム塩等があげられる。

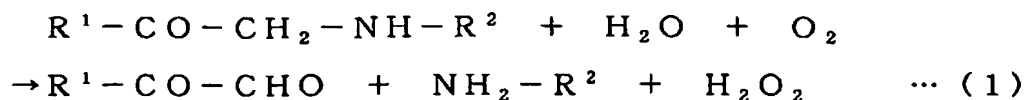


また、前記テトラゾリウム化合物は、前述のような化合物には制限されず、この他に、前記テトラゾール環の2箇所にベンゼン環構造置換基および1箇所にその他の環構造置換基を有する化合物も使用でき、例えば、2,3-ジフェニル-5-(2-チエニル)テトラゾリウム塩、2-ベンゾチア  
5    ゾイル-3-(4-カルボキシ-2-メトキシフェニル)-5-[4-(2-スルホエチル  
      カルバモイル)フェニル]-2H-テトラゾリウム塩、2,2'-ジベンゾチア  
      ゾイル-5,5'-ビス[4-ジ(2-スルホエチル)カルバモイルフェニル]-3,3'-(  
      3,3'-ジメトキシ-4,4'-ビフェニレン)ジテトラゾリウム塩および3-(4,5-  
      ジメチル-2-チアゾイル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウム塩等があ  
10    げられる。

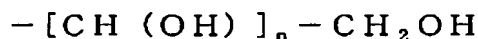
また、前記テトラゾール環の2箇所にベンゼン環構造置換基および1箇所に環構造でない置換基を有するテトラゾリウム化合物も使用でき、例えば、2,3-ジフェニル-5-シアノテトラゾリウム塩、2,3-ジフェニル-  
5-カルボキシテトラゾリウム塩、2,3-ジフェニル-5-メチルテトラゾリ  
15    ウム塩、2,3-ジフェニル-5-エチルテトラゾリウム塩等があげられる。

前述のテトラゾリウム化合物の中でも、前述のように、環構造置換基を3つ有する化合物が好ましく、より好ましくは、環構造がベンゼン環である置換基を3つ有し、かつ電子吸引性官能基を多く有するものであり、特に好ましくは、2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)  
20    )-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩である。なお、このようなテトラゾリウム化合物は、例えば、塩でもよいし、イオン化された状態等であってもよい。

前記FAODとしては、下記式(1)に示す反応を触媒するFAOD  
25    であることが好ましい。



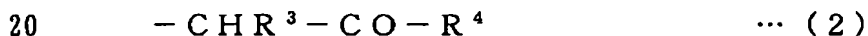
前記式(1)において、 $R^1$ は、水酸基もしくは糖化反応前の糖に由来する残基(糖残基)を示す。前記糖残基( $R^1$ )は、反応前の糖がアルドースの場合はアルドース残基であり、反応前の糖がケトースの場合、ケトース残基である。例えば、反応前の糖がグルコースの場合は、ア  
マドリ転位により、反応後の構造はフルクトース構造をとるが、この場  
合、糖残基( $R^1$ )は、グルコース残基(アルドース残基)となる。こ  
の糖残基( $R^1$ )は、例えば、



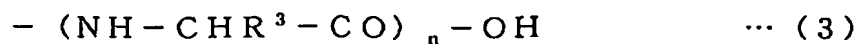
で示すことができ、 $n$ は、0～6の整数である。

前記式(1)において、 $R^2$ は、特に制限されないが、例えば、糖化アミノ酸、糖化ペプチドまたは糖化タンパク質の場合、 $\alpha$ -アミノ基が  
糖化されている場合と、それ以外のアミノ基が糖化されている場合とで  
異なる。

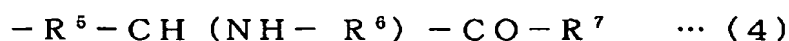
前記式(1)において、 $\alpha$ -アミノ基が糖化されている場合、 $R^2$ は、下記式(2)で示すアミノ酸残基またはペプチド残基である。



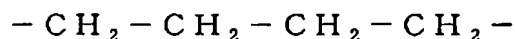
前記式(2)において、 $R^3$ はアミノ酸側鎖基を示す。また、 $R^4$ は水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基を示し、例えば、下記式(3)で示すことができる。下記式(3)において、 $n$ は、0以上の整数で  
あり、 $R^3$ は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示す。



また、前記式（１）において、 $\alpha$ -アミノ基以外のアミノ基が糖化されている（アミノ酸側鎖基が糖化されている）場合、 $R^2$ は下記式（４）で示することができる。



前記式（４）において、 $R^5$ は、アミノ酸側鎖基のうち、糖化されたアミノ基以外の部分を示す。例えば、糖化されたアミノ酸がリジンの場合、 $R^5$ は



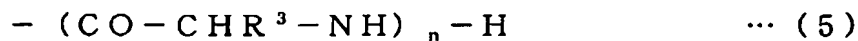
であり、

例えば、糖化されたアミノ酸がアルギニンの場合、 $R^5$ は、



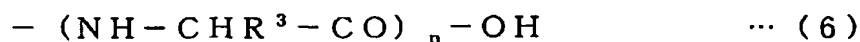
である。

また、前記式（４）において、 $R^6$ は、水素、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式（５）で示することができる。なお、下記式（５）において、 $n$ は０以上の整数であり、 $R^3$ は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示す。



また、前記式（４）において、 $R^7$ は、水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式（６）で示することができる。なお

、下記式(6)において、 $n$ は0以上の整数であり、 $R^3$ は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示す。



5

前記FAODとしては、例えば、以下の菌から生産されるものも使用できる。そのような菌としては、例えば、フサリウム属(fusarium)、ギベレラ属(Gibberella)、ペニシリウム属(Penicillium)、アルミラリア属(Armillaria)、カルダリオマイセス属(Caldariomyces)、ガノデルマ属(Ganoderma)、アスペルギルス属(Aspergillus)等に属する菌があげられる。具体例には、例えば、フサリウム・オキシスポルムS-1F4(Fusarium oxysporum S-1F4) (FERM BP-5010)、フサリウム・オキシスポルム・f.sp. リニ(Fusarium oxysporum f.sp. lini) (IFO NO.5880)、フサリウム・オキシスポルム・f.sp. バタタス(Fusarium oxysporum f.sp. bata  
10 tas) (IFO NO.4468)、フサリウム・オキシスポルム・f.sp. ニベウム(Fusarium oxysporum f.sp. niveum) (IFO NO.4471)、フサリウム・オキシスポルム・f.sp. ククメリニウム(Fusarium oxysporum f.sp. cucumerium) (IFO NO.6384)、フサリウム・オキシスポルム・f.SP. メロンゲナエ(Fusarium oxysporum f.sp. melongenae) (IFO NO.7706)、フサリウム・オキシ  
15 スポルム・f.sp. アピ(Fusarium oxysporum f.sp. apii) (IFO NO.9964)、フサリウム・オキシスポルム・f.sp. ピニ(Fusarium oxysporum f.SP. pini) (IFO NO.9971)、フサリウム・オキシスポルム・f.sp. フラガリエ(Fusarium oxysporum f.sp. fragariae) (IFO NO.31180)、ギベレラ・フジクロイ(Gibberella fujikuroi) (IFO NO.6356,6605)、ペニシリウム  
20 ・ヤンシネルムS-3413(Penicillium janthinellum S-3413) (FERM BP-5475)、ペニシリウム・ヤンシネルム(Penicillium janthinellum) (IFO NO

- .4651、6581、7905)、ペニシリウム・オキサリウム(Penicillium oxalicum) (IFO NO. 5748)、ペニシリウム・ヤバニウム(Penicillium javanicum) (IFO NO. 4639)、ペニシリウム・クリソゲナム(Penicillium chrysogenum) (IFO NO. 4897)、ペニシリウム・シアネウム(Penicillium cyaneum) (IFO NO. 5337)、アスペルギルス・テレウス(Aspergillus terreus) (IFO 6365)、アスペルギルス・テレウスGP-1(Aspergillus terreus GP-1) (FERM BP-5684)、アスペルギルス・オリザ(Aspergillus oryzae) (IFO 4242)、アスペルギルス・オリザ(Aspergillus oryzae) (IFO 5710)等があげられる。
- 10      また、市販のF A O Dとしては、例えば、 $\alpha$ -アミノ基が糖化された糖化アミノ酸に特異的に作用する商品名フルクトシル-アミノ酸オキシダーゼ (F A O X - E) (キッコーマン社製)、商品名フルクトシルアミンオキシダーゼ (旭化成社製) 等があげられる。
- 15      つぎに、本発明の測定方法について、血球中の糖化タンパク質を測定する例をあげて説明する。
- まず、全血をそのまま溶血し、または全血から遠心分離等の常法により血球画分を分離してこれを溶血し、溶血試料を調製する。この溶血方法は、特に制限されず、例えば、界面活性剤を用いる方法、超音波による方法、浸透圧の差を利用する方法、凍結溶解による方法等が使用できる。この中でも、操作の簡便性等の理由から、前記界面活性剤を用いる方法が好ましい。
- 20      前記界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレン-p-1-オクチルフェニルエーテル (T r i t o n系界面活性剤等)、ポリエチレンソルビタンアルキルエステル (T w e e n系界面活性剤等)、ポリオキシエチレンアルキルエーテル (B r i j系界面活性剤等) 等の非イオン

性界面活性剤が使用でき、具体的には、例えば、T r i t o n X-100、T w e e n-20、B r i j 35等があげられる。前記界面活性剤による処理条件は、通常、処理溶液中の血球濃度が、1～10体積%の場合、前記処理溶液中の濃度が0.01～5重量%になるように前記界面活性剤を添加し、室温で、数秒（約5秒）～10分程度攪拌すればよい。

つぎに、前記溶血試料に対し、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを添加する。

このようにテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを添加することにより、無添加の場合に比べて、その感度が、約1.2～3倍の範囲で向上する。

前記テトラゾリウム化合物は、例えば、処理溶液中の血球濃度が、0.2～2体積%の場合、濃度0.005～400mmol/Lの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.02～100mmol/Lの範囲、特に好ましくは0.1～50mmol/Lの範囲である。具体的に、前記テトラゾリウム化合物が2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩の場合は、濃度0.004～16mmol/Lの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.02～10mmol/Lの範囲、特に好ましくは0.1～5mmol/Lの範囲である。なお、前記テトラゾリウム化合物は、一種類でもよいし、二種類以上を併用してもよい。

また、前記テトラゾリウム化合物（A）とアジ化ナトリウム（B）の添加割合（モル比A：B）は、例えば、A：B=20：3～20：12の範囲であり、好ましくは20：5～20：11の範囲、より好ましくは20：6～20：10の範囲である。

前記テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムは、そのまま前記溶血試料に添加してもよい。しかし、操作の簡便性等の点から、溶媒に溶解したテトラゾリウム化合物溶液およびアジ化ナトリウム溶液として、または、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムの両方を含有する混合液（テトラゾリウム化合物・アジ化ナトリウム混合液）として使用することが好ましい。

前記各種溶液におけるテトラゾリウム化合物（C）またはアジ化ナトリウム（D）の濃度は、前記溶血試料に添加する場合の希釈倍率等に応じて適宜決定できるが、テトラゾリウム化合物（C）の濃度は、例えば、 $0.6 \sim 10 \text{ mmol/L}$ の範囲であり、好ましくは、 $0.75 \sim 3 \text{ mmol/L}$ の範囲であり、より好ましくは $1 \sim 2.4 \text{ mmol/L}$ の範囲である。また、前記混合液の場合、テトラゾリウム化合物（C）とアジ化ナトリウム（D）との配合割合（モル比C : D）は、例えば、C : D =  $20 : 5 \sim 20 : 11$ の範囲であり、好ましくは $20 : 6 \sim 20 : 8$ の範囲である。

前記溶液の溶媒としては、例えば、MOPS、MES、MOPSO、DIPSO、TES、POPSO、HEPES等のグッドの緩衝液や、リン酸緩衝液等が使用でき、好ましくは、MES、MOPSである。前記溶媒のpHは、例えば、 $5.0 \sim 7.0$ の範囲であり、好ましくは、 $5.5 \sim 6.5$ の範囲であり、より好ましくは5.5である。また、前記緩衝液の濃度は、例えば、 $1 \sim 100 \text{ mmol/L}$ の範囲、好ましくは、 $1 \sim 10 \text{ mmol/L}$ の範囲であり、前記溶血試料に添加した場合の処理溶液における最終濃度は、例えば、 $0.7 \sim 9 \text{ mmol/L}$ の範囲、好ましくは、 $0.8 \sim 4.5 \text{ mmol/L}$ の範囲である。

また、より一層の感度向上が可能であることから、調製した前記テトラゾリウム化合物・アジ化ナトリウム混合液を、前記溶血試料に添加す

る前に、一定時間放置することによってエージングすることが好ましい。  
このエージング処理によって、感度が、エージングしない場合よりも、  
例えば、約1.2～3倍に向上する。

前記エージングにおいて、例えば、処理温度は、40～60℃の範囲  
5 が好ましく、より好ましくは50～60℃の範囲である。処理時間は、  
例えば、6時間以上であり、好ましくは6～120時間の範囲、より好  
ましくは6～72時間の範囲である。

前記溶血試料に対して、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウム  
を直接または前記溶液として添加した後、通常、処理温度40～60  
10 ℃の範囲で、6～72時間インキュベートし、前記試料の前処理を行う。  
このように試料をテトラゾリウム化合物で前処理することによって、  
前記試料中に含まれる還元物質等が酸化還元反応に与える影響を除去で  
き、測定精度が向上できるからである。そして、このようにテトラゾリ  
ウム化合物は、測定精度の向上にも寄与するが、本発明の目的である測  
15 定感度の向上には、テトラゾリウム化合物だけでなくアジ化ナトリウムの  
共存が必要であり、それによって本発明に特有の効果が奏される。

続いて、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを添加した前  
処理済み溶血試料について、プロテアーゼ処理を行う。これは、後の処  
理に使用するFAODを、測定対象物に作用し易くするためである。

20 前記プロテアーゼとしては、特に制限されないが、例えば、セリンプロ  
テアーゼ、チオールプロテアーゼ、メタロプロティナーゼ等が使用で  
き、具体的には、トリプシン、プロテナーゼK、キモトリプシン、パパ  
イン、プロメライン、ズブチリシン、エラスターゼ、アミノペプチダー  
ゼ等が好ましい。また、分解する糖化タンパク質が糖化ヘモグロビンの  
25 場合、前記プロテアーゼは、前記糖化ヘモグロビンを選択的に分解する  
プロテアーゼであり、プロメライン、パパイン、ブタ膵臓由来トリプシ



ン、メタロプロティナーゼ、Bacillus subtilis由来のプロテアーゼ等が好ましい。前記Bacillus subtilis由来プロテアーゼとしては、商品名プロテアーゼN（例えば、フルカ社製）、商品名プロテアーゼN「アマノ」（天野製薬社製）等があげられる。前記メタロプロティナーゼ  
5 としては、Bacillus属由来メタロプロティナーゼ（EC 3. 4. 2 4. 4）（例えば、東洋紡社製：商品名トヨチーム）等があげられる。これらの中でもより好ましくはメタロプロティナーゼ、プロメライン、パパイ  
ンであり、特に好ましくはメタロプロティナーゼである。このように、選択的に分解するプロテアーゼを使用すれば、特定のタンパク質の分  
10 解物を選択的に調製できる。前記プロテアーゼ処理は、通常、緩衝液中で行われ、その処理条件は、使用するプロテアーゼの種類、測定対象物である糖化タンパク質の種類およびその濃度等により適宜決定される。

前記緩衝液としては、例えば、CHES緩衝液、CAPSO緩衝液、CAPS緩衝液、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、EPPS緩衝液、H  
15 EPES緩衝液等が使用できる。そのpHは、例えば、6～13の範囲であり、好ましくは7～11の範囲である。また、プロテアーゼ処理溶液における前記緩衝液の最終濃度は、例えば、1. 0～10 mmol/Lの範囲である。

具体的には、例えば、前記プロテアーゼとしてメタロプロティナーゼ  
20 を用いて前記前処理済み溶血試料を処理する場合、通常、反応液中のメタロプロティナーゼ濃度0. 1～40 MU/L、反応液中の血球濃度0. 05～15体積%、反応温度15～37℃、反応時間1分～24時間、pH6～12の範囲である。

また、例えば、前記プロテアーゼとしてプロテアーゼKを用いて前記  
25 前処理済み溶血試料を処理する場合、通常、反応液中のプロテアーゼ濃度10～300 KU/L、反応液中の血球濃度0. 05～15体積%、

反応温度 15 ~ 37℃、反応時間 1 分 ~ 24 時間、pH 6 ~ 12 の範囲である。また、前記緩衝液の種類も特に制限されず、例えば、トリス塩酸緩衝液、EPPS 緩衝液、PIPES 緩衝液等が使用できる。

つぎに、前記プロテアーゼ処理により得られた分解物を、前記 FAOD  
5 D で処理する。この FAOD 処理により、前記式 (1) に示す反応が触媒される。

この FAOD 処理は、前記プロテアーゼ処理と同様に緩衝液中で行うことが好ましく、その処理条件は、使用する FAOD の種類、測定対象物である糖化タンパク質の種類およびその濃度等により適宜決定される  
10 。

具体的には、例えば、反応液中の FAOD 濃度 50 ~ 50,000 U / L、反応液中の血球濃度 0.01 ~ 1 体積%、反応温度 15 ~ 37℃、反応時間 1 ~ 60 分、pH 6 ~ 9 の範囲である。また、前記緩衝液の種類も特に制限されず、前記プロテアーゼ処理と同様の緩衝液が使用で  
15 きる。

つぎに、前記 FAOD 処理で生成した過酸化水素を、POD および前記発色性基質を用いて酸化還元反応により測定する。

前記発色性基質としては、例えば、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム、オルトフェニレンジアミン(OPD)、トリンダー試薬と 4-アミノアンチピリンとを組み合わせた基質等があげらる。前記トリンダー試薬としては、例えば、フェノール、フェノール誘導体、アニリン誘導体、ナフトール、ナフトール誘導体、ナフチルアミン、ナフチルアミン誘導体等があげらる。また、前記アミノアンチピリンの他に、アミノア  
20 ンチピリン誘導体、パニレンジアミンスルホン酸、メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン(MBTH)、スルホン化メチルベンズチアゾリノン  
25

ヒドラゾン（SMBTH）等も使用できる。このような発色性基質の中でも、特に好ましくは、N-（カルボキシメチルアミノカルボニル）-4, 4'-ビス（ジメチルアミノ）ジフェニルアミンナトリウムである。

- 5 前記酸化還元反応は、通常、緩衝液中で行われ、その条件は、前記生成した過酸化水素の濃度等により適宜決定される。通常、反応液中のP  
OD濃度10～100, 000 IU/L、発色性基質濃度0.005  
～30 mmol/L、反応温度15～37℃、反応時間0.1～30分  
、pH5～9である。また、前記緩衝液は、特に制限されず、例えば、  
10 前記プロテアーゼ処理およびFAOD処理等と同様の緩衝液等が使用で  
きる。

- 前記酸化還元反応において、例えば、前記発色性基質を用いた場合、  
前記反応液の発色程度（吸光度）を分光光度計で測定することにより、  
過酸化水素の量を測定できる。そして、例えば、この過酸化水素濃度と  
15 検量線等とを用いて、試料中の糖化タンパク質量を求めることができる  
。

- 前記発色程度は、例えば、吸光度測定以外にも、反射率等の光学的測  
定によって測定することもできる。また、前記過酸化水素量は、前記P  
OD等を用いた酵素的手法の他に、例えば、電気的手法により測定する  
20 こともできる。

このように、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを添加す  
れば、酸化還元反応を利用する前記糖化タンパク質の測定を感度よく行  
うことができる。

- 25 テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムの添加工程の順序は、  
特に制限されないが、前述のように、前記両者をエージングすることに

よって、より一層の効果が得られることから、予め両者を混合しておくことが好ましい。

また、前述のように、測定対象物は、酸化還元反応を利用するものであれば、特に制限されず、前記糖化タンパク質の他に、例えば、糖化ペ  
5 プチド、糖化アミノ酸、グルコース、コレステロール、尿酸、クレアチ  
ニン、サルコシン、グリセロール等があげられる。これらを測定する場  
合は、例えば、前述と同様にして測定試料にテトラゾリウム化合物およ  
びアジ化ナトリウムを添加した後、以下に示すように測定対象物由来の  
還元物質または酸化物質を生成して、その量を酸化還元反応により測定  
10 すればよい。

過酸化水素を発生させて、前記各測定対象物の量を測定する場合は、  
例えば、前記グルコースにはグルコースオキシダーゼを、前記コレステ  
ロールにはコレステロールオキシダーゼを、前記尿酸にはウリカーゼを  
、前記クレアチニンにはサルコシンオキシダーゼを、前記サルコシンに  
15 はサルコシンオキシダーゼを、前記グリセロールにはグリセロールオキ  
シダーゼを、それぞれ作用させて過酸化水素を発生させればよい。この  
過酸化水素量の測定方法は、前述と同様にして行なうことができる。ま  
た、糖化ペプチド、糖化アミノ酸は、例えば、前記糖化タンパク質の測  
定と同様にして測定できる。

20 また、前記測定対象物由来の還元物質を発生させ、この量を酸化還元  
反応により測定し、この測定値から、前記測定対象物の量を決定する場  
合は、例えば、以下に示すようにして測定を行なうことができる。

前記測定対象物がグルコースの場合、例えば、NADやNADP等の  
存在下、グルコースデヒドロゲナーゼを用いて、NADHやNADPH  
25 等の還元物質を発生させる。そして、前記測定対象物由来の還元物質で  
あるNADHやNADPHを、例えば、ジアホラーゼと、還元により発

色する基質とを用いて、酸化還元反応により測定する。そして、前述のように、例えば、この測定対象物由来の還元物質の濃度と検量線等とを用いて、試料中の測定対象物の量を求めることができる。また、例えば、測定対象物がコレステロールの場合はコレステロールデヒドロゲナーゼを、サルコシンの場合は、サルコシンデヒドロゲナーゼをそれぞれ使用できる。

前記還元により発色する基質としては、特に制限されず、例えば、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール等も使用できる。なお、より優れた信頼性の測定値を得るために、例えば、前記測定対象物由来の還元物質を測定する前に、予め吸光度を測定しておくことが好ましい。

#### 実施例

##### (実施例 1 および比較例 1)

まず、Hb濃度150 g/L (HbA1c 5.8%)の血液に、下記溶血試薬0.3 mLを添加して溶血させ、溶血試料を調製した。この溶血試料25  $\mu$ Lに精製水20  $\mu$ Lを混合し、さらに、3 g/L アジ化ナトリウム水溶液を所定濃度(0 mmol/L, 0.30 mmol/L, 0.616 mmol/L, 0.924 mmol/L, 1.232 mmol/L, 1.54 mmol/L)含有する下記第1試薬65  $\mu$ Lをそれぞれ添加して、37℃で5分間インキュベートした。なお、前記第1試薬は、前記溶血試料に添加する前に、50℃で20時間エー

15 20 25

ジング処理を行った。続いて、下記発色試薬A 45  $\mu$ Lを添加して37℃で3分間インキュベートした後、この反応液について、生化学自動分析機(商品名Bio Majesty:日本電子社製)を用いて、主波長751 nm、副波長805 nmの吸収を測定した。これらの結果を下記表1に示す。なお、アジ化ナトリウム無添加(0 g/L)のものが比較例1となる。

(溶血試薬：pH9.0)

CHES緩衝液 380 mmol/L

ポリオキシエチレンラウリルエーテル 24 g/L

5

(第1試薬)

100 mmol/L MOPS (pH6.0) 0.15 mL

13 MU/L メタロプロティナーゼ 0.60 mL

10 mmol/L テトラゾリウム化合物 0.60 mL

10 20 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  0.045 mL

3 g/L  $\text{NaN}_3$  所定量

蒸留水 残分

全量 3.0 mL

15 前記メタロプロティナーゼとしては、Bacillus属由来メタロプロティナーゼを、テトラゾリウム化合物としては、2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩(商品名WST-3、同仁化学社製、以下「WST-3」という)を使用した。

20

(発色試薬A)

FAOD(商品名フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、アークレイ社製、以下同じ) 26.0 KU/L

POD(東洋紡社製、以下同じ) 77.6 KU/L

発色基質(商品名DA-64、和光純薬工業社製、以下同じ) 0.052 mmol/L

25 Tris-HCl緩衝液(pH6.9) 200 mmol/L

(表 1)

		第 1 試薬における アジ化ナトリウム終濃度 (mmol/L)	第 1 試薬における テトラゾリウム化合物濃度 (mmol/L)	吸光度
5	比較例 1	0	2	0.0124
	実施例 1	0.300	2	0.0476
		0.616	2	0.0518
		0.924	2	0.0475
		1.232	2	0.0418
10		1.540	2	0.0275

前記表 1 に示すように、実施例 1 ではテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムの存在下で測定を行うことにより、発色基質 DA-64 の発色量が増加したため、比較例 1 よりも高い吸光度が得られた。この  
 15 ことから、本発明の測定方法によれば、測定感度が向上するといえる。

## (実施例 2 および比較例 2)

この実施例は、WST-3 とアジ化ナトリウムの添加割合を変化させ、かつ前記両者のエージングによる、さらなる感度の向上を確認した例  
 20 である。

## (試薬サンプル)

WST-3 とアジ化ナトリウムとを下記添加割合となるように混合して、試薬サンプル (A) ~ (E) を調製した。そして、サンプル (B) ~ (E) については、40℃で20時間インキュベートを行った。続いて、サンプル (A) ~ (E) を 4℃以下に保ち、メタロプロティナーゼ  
 25

を2.66 MU/Lとなるように添加した。

(添加割合)

実施例 2

5		(A)	(B)	(C)	(D)	(E)
	WST-3 (mmol/L)	2.0	2.0	2.0	2.7	1.3
	NaN <sub>3</sub> (mmol/L)	0.7	0.7	1.4	1.4	0.7
	WST-3:NaN <sub>3</sub> (mol比)	3:1	3:1	1.43:1	1.9:1	1.9:1
	MOPS pH6.5 (mmol/L)	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
10	CaCl <sub>2</sub> (mmol/L)	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
	NaCl (mmol/L)	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
	エーゼン	—	○	○	○	○

(溶血溶液)

- 15 血球に蒸留水を添加し、これを凍結させた後、溶解することによって血球の溶血を行った。これによって得られた溶血溶液は、Hb濃度が100 g/L、HbA1cが4.9%であった。

調製した前記溶血試料に、下記組成となるように下記前処理試薬を添加し、前処理を行った。

20



H b 濃度				
	6.7g/L	13.4g/L	20.1g/L	33.5g/L
溶血溶液	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	150 $\mu$ L	250 $\mu$ L
前処理試薬	434 $\mu$ L	434 $\mu$ L	434 $\mu$ L	434 $\mu$ L
5 蒸留水	266 $\mu$ L	216 $\mu$ L	166 $\mu$ L	66 $\mu$ L
全量750 $\mu$ L				

前記前処理試薬は、界面活性剤を20重量%となるように緩衝液と混合して調製した。前記界面活性剤としては、ポリオキシエチレンラウリルエーテル（商品名N i k k o l、日本サーファクタント社製）を使用した。また、緩衝液としては、グリシンアミドの終濃度が200 mM、グリシンの終濃度が40 mMとなるように、グリシンアミド緩衝液とグリシン溶液とを混合した混合緩衝液を使用した（pH9.5）。

15 （発色試薬B）

FAOD	25.9 KU/L
POD	77.6 KU/L
発色基質	0.0518 mmol/L
Tris-HCl緩衝液(pH6.9)	200 mmol/L

20

（測定方法）

前記溶血溶液を蒸留水で2.4倍希釈した希釈液20  $\mu$  Lに、前記各試薬サンプル60  $\mu$  L、前記発色試薬B 50  $\mu$  Lを添加して、37℃で15分間反応させ、生化学自動分析機（商品名JCA-BM8：日本電子社製）により、主波長751 nm、副波長805 nmの吸収を測定した。これらの結果を下記表2および図1のグラフに示す。前記図1は

、添加したテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムのモル比と、  
Hb濃度と、吸光度との関係を示すグラフである。

(表 2)

5		実施例 2				
	Hb濃度	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)
	0g/L	0.1542	0.1628	0.1469	0.1403	0.1647
	6.7g/L	0.0034	0.0101	0.0087	0.0099	0.0097
	13.4g/L	0.0063	0.0180	0.0146	0.0173	0.0171
10	20.1g/L	0.0094	0.0259	0.0202	0.0249	0.0243
	33.5g/L	0.0127	0.0384	0.0278	0.0374	0.0349

前記表 2 および図 1 に示すように、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを添加することによって高い吸光度を示し、さらにインキュベート（エージング）を行うことによって、より一層吸光度が向上した（(B) ～ (E)）。また、Hb濃度の増加に伴って吸光度が増加していることから、添加したテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウム自身の吸収によって吸光度が増加しているのではなく、これらの添加により発色基質 DA-64 の吸光度が増加しているといえる。また、テトラ  
20   ゾリウム化合物とアジ化ナトリウムの添加割合がモル比 3 : 1 であり、かつエージングした場合に、高い吸光度の増加が見られた。このようにテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを添加することによって、発色基質の発色量が増加し、さらにエージングすることによってより一層増加が見られることから、測定感度が向上したといえる。

## (実施例 3)

この実施例は、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを溶液中でエージングすることによる測定感度の向上を調べた例である。

まず、WST-3 濃度が  $3.33 \text{ mmol/L}$  であり、アジ化ナトリウム濃度が  $0.0833 \text{ g/L}$  である混合液を準備した。そして、これを  $60^\circ\text{C}$  でインキュベートすることによりエージングを行い、所定の時間（0 時間、1 時間、6 時間、14 時間、16 時間、18 時間）にサンプリングしたものを試薬サンプルとした。

一方、前記実施例 2 と同様にして溶血溶液（Hb 濃度  $100 \text{ g/L}$ 、HbA1c  $4.9\%$ ）を調製し、所定量（ $2 \mu\text{L}$ 、 $5 \mu\text{L}$ 、 $10 \mu\text{L}$ 、 $20 \mu\text{L}$ 、 $30 \mu\text{L}$ ）の前記溶血溶液と、下記前処理試薬  $300 \mu\text{L}$  と混合して、基質 Hb 溶液（A～E）調製した。

## (前処理試薬)

15       $80 \text{ mmol/L}$     CHES と  $30 \text{ mmol/L}$     MOPS の混合液 (pH9.4)  
          $9 \text{ g/L}$             ポリオキシエチレンラウリルエーテル

そして、前記基質 Hb 溶液を蒸留水で 2 倍希釈した希釈液  $20 \mu\text{L}$  に、前記試薬サンプルを含む下記第 2 試薬  $65 \mu\text{L}$  および発色試薬 C  $45 \mu\text{L}$  を添加して、 $37^\circ\text{C}$  で 15 分間反応させ、前記生化学自動分析機により、主波長  $751 \text{ nm}$ 、副波長  $805 \text{ nm}$  の吸収を測定した。なお、これらの結果を下記表 3 および図 2 に示す。前記図 2 は、エージングの時間と吸光度の関係を示すグラフである。

## (第2試薬)

	試薬サンプル	4.2 mL
	1 mol/L CaCl <sub>2</sub>	0.035 mL
	5 mol/L NaCl	0.280 mL
5	30 mmol/L MES (pH5.5)	1.40 mL
	100 MU/L マクロブロティナーゼ	0.7 mL
	蒸留水	0.385 mL
全量		7.0 mL

## 10 (発色試薬C)

FAOD	25.9 KU/L
POD	77.6 KU/L
発色基質	0.0518 mmol/L
Tris-HCl緩衝液 (pH7.0)	300 mmol/L

15

## (表3)

I-ジング時間		Hb終濃度				
		(A)	(B)	(C)	(D)	(E)
(時間)		0.10g/L	0.25g/L	0.50g/L	0.96g/L	1.40g/L
20	0	0.0003	0.0007	0.0015	0.0037	0.0065
	1	0.0003	0.0008	0.0017	0.0042	0.0073
	6	0.0008	0.0020	0.0039	0.0084	0.0129
	14	0.0009	0.0020	0.0039	0.0084	0.0130
	16	0.0008	0.0020	0.0039	0.0083	0.0128
25	18	0.0008	0.0020	0.0039	0.0083	0.0129

前記表 3 および図 2 に示すように、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを含む溶液をエージングした後に使用することによって、Hb 濃度に関わらず、測定感度はさらに向上することがわかった。また、エージング処理の時間が、6 時間以上である場合に、測定感度は最大  
5 となった。

#### (実施例 4)

この実施例は、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを溶液中でエージングすることによる測定感度の向上を調べた例である。

10 まず、WST-3 およびアジ化ナトリウムを含む下記混合液を調製して、これを所定温度（30℃、40℃、50℃、60℃）で所定時間（0 時間、6 時間、15 時間、24 時間、48 時間、72 時間）インキュベートしてエージングを行ったものを試薬サンプルとした。

#### 15 (混合液組成)

WST-3	2.20 mmol/L
アジ化ナトリウム	0.05 g/L
MOPS (pH6.5)	5.50 mmol/L
CaCl <sub>2</sub>	5.50 mmol/L
20 NaCl	330 mmol/L

一方、実施例 2 と同様にして調製した基質 Hb 溶液（Hb 濃度 100 g/L）を精製水で 2 倍希釈（体積）し、希釈溶液を調製した。また、エージングした前記試薬サンプル 9 mL とメタロプロティナーゼ（2.7 MU/L）1 mL とを混合して、メタロプロティナーゼ溶液を調製した。そして、前記希釈溶液 20 μL に、前記メタロプロティナーゼ溶液  
25

65  $\mu$ L および前記発色試薬 A 45  $\mu$ L を添加して、37℃で15分  
間反応させ、前記生化学自動分析機により、主波長751nm、副波長  
805nmの吸収を測定した。なお、これらの結果を下記表4および図  
3に示す。前記図3は、エージングの時間と吸光度の関係を示すグラフ  
5 である。

(表4)

エージング時間		エージング温度			
(時間)		30℃	40℃	50℃	60℃
10	0	0.0078	0.0078	0.0078	0.0078
	6	0.0211	0.0244	0.0253	0.0277
	24	0.0259	0.0270	0.0323	0.0320
	48	0.0271	0.0286	0.0288	0.0301
	72	0.0302	0.0311	0.0311	0.0308

15

前記表4および図3に示すように、60℃でエージングした場合に速  
やかに吸光度が増加したことから、エージング温度が高い程、短時間の  
エージング処理で測定感度を向上できるといえる。

## 20 産業上の利用の可能性

以上のように、本発明の酸化還元反応を用いた測定方法は、テトラゾ  
リウム化合物およびアジ化ナトリウムを用いるため、測定感度に優れて  
いる。このため、本発明の測定方法を、例えば、赤血球中のHbA1c  
の測定に適用すれば、従来よりも測定精度が高い測定を実現でき、この  
25 結果、HbA1cの糖尿病診断等の指標物質としての重要性がさらに向  
上する。

## 請 求 の 範 囲

1. 試料中の測定対象物を酸化還元反応を用いて測定する方法であって、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムの存在下で、前記測定対象物由来の還元物質または酸化物質の量を前記酸化還元反応により測定し、この測定値から前記測定対象物の量を決定することを特徴とする測定方法。  
5
2. テトラゾリウム化合物（A）とアジ化ナトリウム（B）との添加割合（モル比A：B）が、 $A : B = 20 : 3 \sim 20 : 12$ の範囲である請求の範囲1記載の測定方法。  
10
3. 前記酸化還元反応の反応液におけるテトラゾリウム化合物の終濃度が、 $0.5 \sim 2.5 \text{ mmol/L}$ の範囲であり、前記反応溶液におけるアジ化ナトリウムの終濃度が $0.13 \sim 1.3 \text{ mmol/L}$ の範囲である請求の範囲1または2記載の測定方法。  
15
4. テトラゾリウム化合物とアジ化ナトリウムとを含む溶液をエージングした後に、試料に添加する請求の範囲1～3のいずれか一項に記載の測定方法。  
20
5. エージングの処理温度が、 $20 \sim 60^\circ\text{C}$ の範囲である請求の範囲4記載の測定方法。
6. エージングの処理時間が、 $6 \sim 120$ 時間の範囲である請求の範囲4または5記載の測定方法。  
25

7. テトラゾリウム化合物が2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルフィドフェニル)-2H-テトラゾリウム塩である請求の範囲1～6のいずれか一項に記載の方法。

5

8. 測定対象物が、糖化タンパク質、糖化ペプチドおよび糖化アミノ酸からなる群から選択された少なくとも一つである請求の範囲1～7のいずれか一項に記載の方法。

10 9. 糖化タンパク質が、糖化ヘモグロビンである請求の範囲8記載の方法。

10. 測定対象物由来の酸化物質が、過酸化水素である請求の範囲1～9のいずれか一項に記載の方法。

15

11. 過酸化水素が、糖化タンパク質の糖化部分とフルクトシルアミノ酸オキシダーゼとの反応により生成する過酸化水素である請求の範囲10に記載の方法。

20 12. 酸化物質である過酸化水素の量の測定が、酸化酵素と酸化により発色する基質とを用いた測定である請求の範囲10または11記載の方法。

13. 前記過酸化水素の測定が、酸化により発色する基質の発色程度  
25 の光学的な測定である請求の範囲12記載の方法。



- 1 4 . 光学測定が、吸光度または反射率の測定である請求の範囲
- 1 3 記載の方法。

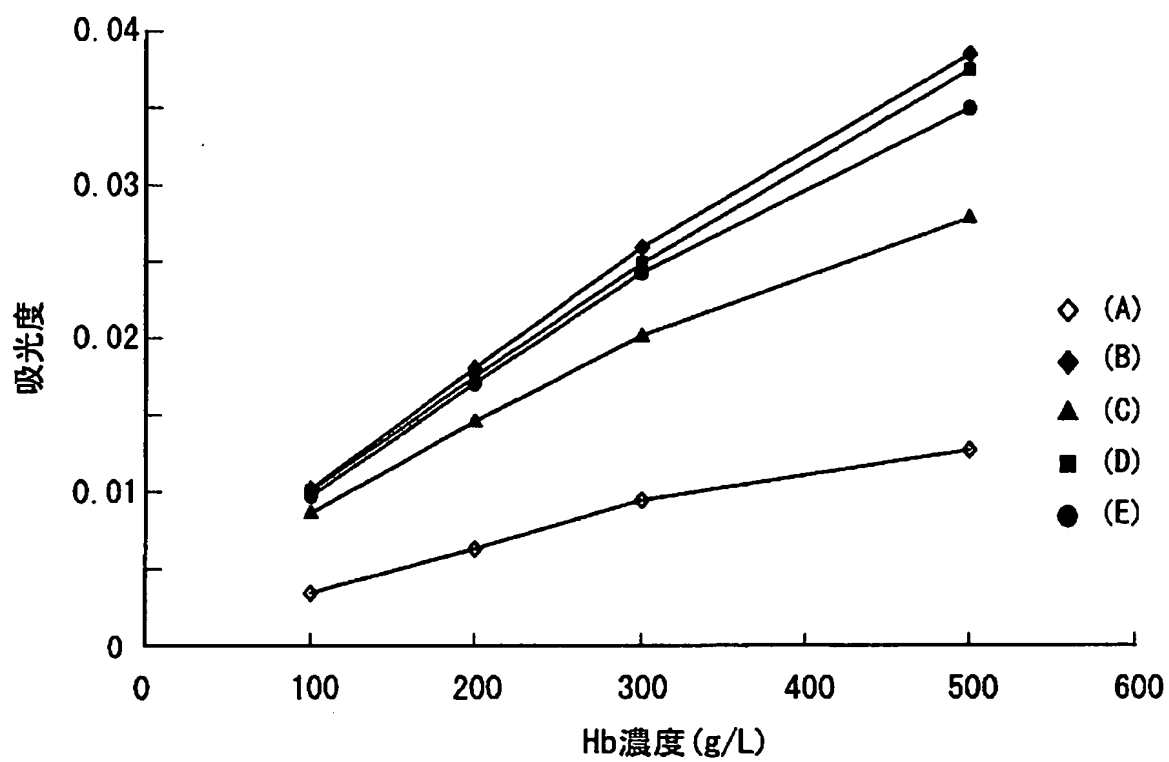


FIG. 1

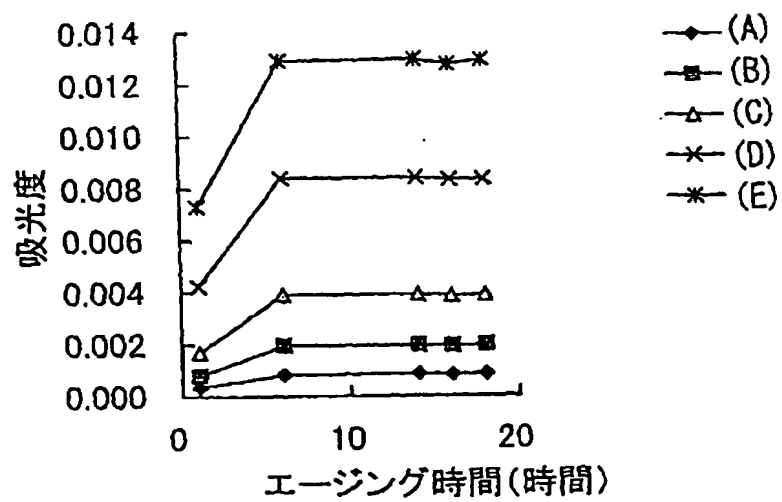


FIG. 2

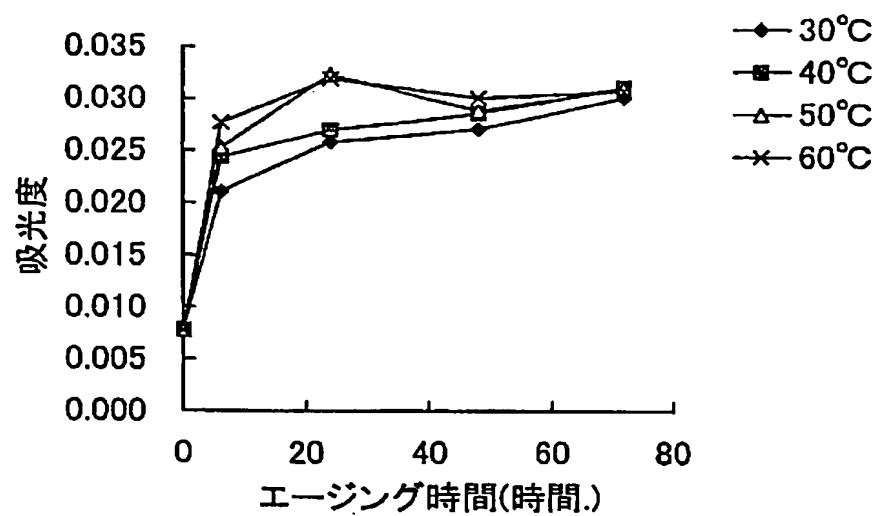


FIG. 3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/10464

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/26, G01N33/50, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/00-70, C12N9/00-99, G01N33/00-98

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	EP 166505 A (Warner-Lambert Co.), 02 January, 1986 (02.01.86), & AU 8540457 A & JP 61-009286 A	1, 4, 5/ 2, 3, 6-14
X/Y	JP 60-214900 A (Kabushiki Kaisha Fujimoto Diagnostics), 28 October, 1985 (28.10.85), (Family: none)	1/2-14
X/Y	Greger Evan A. et al., Measurement of oxidative activity in hemocytes of the pacific razor clam, Siliqua patula, and the oyster, Crassostrea gigas, using lucigenin - and luminol - dependent chemiluminescence., Journal of Invertebrate Pathology, (1995), Vol.65, No.1, pages 48 to 60	1/2-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not

considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing

date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is

cited to establish the publication date of another citation or other

special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other

means

"P" document published prior to the international filing date but later

than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or

priority date and not in conflict with the application but cited to

understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be

considered novel or cannot be considered to involve an inventive

step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be

considered to involve an inventive step when the document is

combined with one or more other such documents, such

combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 December, 2002 (02.12.02)

Date of mailing of the international search report

17 December, 2002 (17.12.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12Q 1/26, G01N33/50, G01N33/15

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12Q 1/00~70, C12N 9/00~99, G01N33/00~98

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	EP 166505 A (WARNER-LAMBERT CO.) 1986.01.02 & AU 8540457 A & JP 61-009286 A	1, 4, 5 / 2, 3, 6-14
X/Y	JP 60-214900 A (株式会社 フジモト・ダイアグノスティックス) 1985.10.28 (ファミリーなし)	1 / 2-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.12.02

国際調査報告の発送日

17.12.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤 真由美

4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	Greger Evan A., et al., Measurement of oxidative activity in hemocytes of the pacific razor clam, <i>Siliqua patula</i> , and the oyster, <i>Crassostrea gigas</i> , using lucigenin - and luminol - dependent chemiluminescence., Journal of Invertebrate Pathology, (1995), Vol. 65, No. 1, p. 48-60	1/2-14